

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 707 064 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
17.04.1996 Patentblatt 1996/16

(51) Int Cl.<sup>6</sup>: C12N 11/04, C12N 11/18,  
C12Q 1/00

(21) Anmeldenummer: 95890148.0

(22) Anmeldetag: 09.08.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
DE GB

(30) Priorität: 05.10.1994 AT 1893/94

(71) Anmelder: AVL Medical Instruments AG  
CH-8207 Schaffhausen (CH)

(72) Erfinder:  
• Offenbacher, Helmut, Dr.  
A-8020 Graz (AT)

• Schaffar, Bernhard, Mag.Dr.  
A-8045 Graz (AT)  
• Ghahramani, Massoud, Dr.  
A-8102 Semriach (AT)

(74) Vertreter: Krause, Walter, Dr. Dipl.-Ing. et al  
Dipl.-Ing. Dr. Walter Krause,  
Dipl.-Ing. Peter Kliment,  
Singerstrasse 8,  
Postfach 200  
A-1014 Wien (AT)

(54) Verfahren zur Immobilisierung biologischer Komponenten in einer Polymermatrix sowie Biosensoren unter Verwendung derartiger Immobilisate

(57) Bei einem Verfahren zur Immobilisierung von biologischen Komponenten, vorzugsweise von Enzymen, in einer Polymermatrix, wird vorgeschlagen, daß zumindest eine biologische Komponente mit einem wasserlöslichen oder in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbaren Präpolymer vermischt wird, welches eine zumindest über weite Sequenzen unpolare Hauptkette aufweist, an welcher direkt oder in Seitenketten polare, hydrophile Gruppen anhaften, und daß das mit der biologischen Komponente vermischte Präpolymer bei Temperaturen von Raumtemperatur bis 70°C, vorzugsweise bis 40°C über vernetzungsfähige Gruppen nach Abdunsten des wäßrigen Lösungsmittels zu einer dreidimensional vernetzenden, hydrophoben Polymermatrix reagiert, in welche die biologische Komponente eingebettet ist.

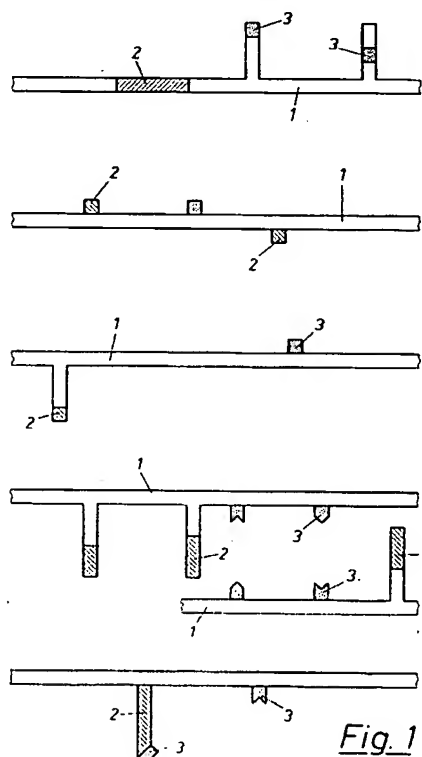


Fig. 1

EP 0 707 064 A2

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Immobilisierung von biologischen Komponenten, vorzugsweise von Enzymen, in einer Polymermatrix, auf ein mit diesem Verfahren hergestelltes Immobilisat, sowie auf Biosensoren unter Verwendung dieses Immobilisates.

Für die Immobilisierung von Enzymen sowie anderen reaktiven biologischen Komponenten und die damit verbundene Nutzbarmachung in diagnostischen Sensorelementen gibt es eine Reihe von Methoden, die im folgenden kurz dargestellt werden.

Folgende Immobilisierungsmethoden sind bis dato bekannt und werden je nach Art der Problemstellung technologisch genutzt:

A) Immobilisierung der biologischen Komponenten durch chemische Bindung

- 1) an ein Trägermaterial
- 2) durch Quervernetzen mit bifunktionellen Vernetzern
- 3) in Polymernetzwerken

B) Adsorptive Bindung der biologischen Komponenten an aktiven Oberflächen

C) Immobilisierung der biologischen Komponente durch physikalische Einbettungsverfahren

D) Hybridverfahren

Im folgenden wird nur auf die verschiedenen Methoden der Immobilisierung durch physikalische Einbettung gemäß Punkt C) in puncto Attraktivität sowie verfahrensimmanenter Problematik näher eingegangen, da die vorliegende Erfindung in diesem Bereich einzuordnen ist.

Bei dieser Art der Immobilisierung werden biologische Komponenten z. B. Enzyme, in makroskopischen bis molekularen Cavitäten einer Einbettungsmatrix eingebracht.

Folgende Methoden sind bekannt:

a) Einlagerung eines Enzymes zwischen zwei für das Enzym impermeablen Membranfolien (z.B. Cellophan).

b) Bereitung einer Emulsion von Enzymlösungen in einem vernetzbaren Polymer - die Enzymlösung liegt nach dem Vernetzen in der Polymermatrix in Tröpfchenform vor.

c) Enzymkristallsuspension in vernetzten bzw. nichtvernetzten Polymeren.

d) Enzymmikrodomänen in einem nichtvernetzten Polymer, herstellbar durch Lösen von Enzymen in Polymer-Wasser-Latices, wobei das zumeist hoch-

molekulare Polymer durch Zusatz von weichmacherähnlichen Verfilmungshilfen beim Trocknen zu einer weitgehend, von Enzym-Mikrotröpfchen durchsetzten, homogenen Thermoplastschicht umgewandelt wird (siehe beispielsweise Polymerdispersion in WO 89/07139).

e) Inkorporierung der biologischen Komponente durch Migration in eine gequollene Harzmatrix (Poly HEMA, Polyacrylamidvernetzt)

f) Inkorporierung der biologischen Komponente durch Polymerfällung in einem wäßrigen Enzym-Polymersystem

g) Immobilisierung der biologischen Komponente durch Einbringen von Enzymen in ein durch Polymerisation vernetzbares wasserlösliches Hydrophilpolymer (z. B. UV-härtender Polyvinylalkohol)

h) Einkapselung der biologischen Komponente in Nanokapseln sowie Zellghosts etc.

Diese Verfahren haben je nach Anwendung und Art der biologischen Komponente Vor- und Nachteile. Als generell nachteilig erwiesen sich für:

a) Abdichtproblematiken sowie homogene Enzymverteilung im Spalt, Fixierung am Transducer sowie Abhängigkeit von Folieneigenschaften

b,c) Inaktivierung der Enzyme durch Vernetzungshilfen wie Katalysatoren, Monomere u. a., ferner sind die für die Einbettung in Frage kommenden Polymermaterialien für hydrophile Substrate schlecht permeabel.

d) Für diese Art der Immobilisierung gelten die selben Nachteile wie in b) und c) angeführt, ferner kommt es bei Langzeitflüssigkontakt zu einer mehr oder weniger starken Reversion des Verfilmungsprozesses, d. h. die Polymerschicht vertrübt sich, wird für das Biopolymer permeabel und wandelt sich in weiterer Folge wieder in eine Latexsuspension um.

e,f) Die Quellung begünstigende Lösungsmittel führen in der Regel zu einer Enzyminaktivierung bzw. da derartige Polymere von Haus aus polar sein müssen, besitzen sie selbst im Wasser eine in Bezug auf Enzymmigration nicht unbedenkliche Quellung. Da es sich bei den hierfür verwendeten Polymeren um nichtvernetzte Systeme handelt, tritt Migration bereits durch Umorientierung der Molekülketten im Zuge einer Matrixrelaxation ein.

g) Die für die Vernetzungsreaktion benötigten Radikalbildner bzw. die für den Start der Vernetzung

benutzte energiereiche Strahlung führt zu einer starken Beeinträchtigung der Enzymaktivität. Die in diesem Zusammenhang bisher bekannten hydrophilen Polymere - es handelt sich dabei vor allem um modifizierte Polyvinylalkohole - besitzen selbst im vernetzten Zustand eine extrem starke Quellung, ferner ist der Vernetzungsgrad vom Wassergehalt des Enzympräpolymerfilms abhängig.

h) Diese Verfahren sind zwar literaturbekannt, erfordern jedoch einen hohen technologischen Aufwand.

Langzeitstabile Biosensoren benötigen Enzymschichten, die zum einen eine hohe Aktivität besitzen, zum anderen eine gute Stabilität in Bezug auf Naßlagerung aufweisen. Demnach ergibt sich für die Immobilisierung biologischer Komponenten folgender Forderungskatalog:

1) Einbringbarkeit großer Mengen an biologischer Komponente in eine derartige Reaktivschicht

2) Kein (bzw. nur geringfügiger) Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung, d. h. Vermeidung von reaktiven Vernetzern, Radikalbildnern, Schwermetallkatalysatoren sowie Vermeidung von beeinträchtigenden Monomeren und Lösungsmitteln.

3) Immobilisierung unter schonenden Bedingungen, d. h. bei möglichst niedriger Temperatur sowie Vermeidung energiereicher Strahlung

4) Gewährleistung einer möglichst hohen Analytpermeabilität bei gleichzeitiger Minimierung der Enzymmigration

5) Aufrechterhaltung der für die Funktion des Enzyms optimalen Tertiärstruktur

6) Ausschließen einer mikrobiellen Befallbarkeit

7) Gewährleistung der Kompatibilität mit biologischen Medien

8) Minimierung von Haftproblematiken (Enzymimmobilisat - sensitive Einheit), hohe Reproduzierbarkeit der Immobilisierung

9) Gewährleistung einer einfachen Herstellungstechnologie

10) Modifizierungsfähigkeit dieser Herstellungstechnologie

Aufgabe dieser Erfindung ist es, möglichst allen angeführten Forderungen weitgehend gerecht zu werden. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zumindest eine biologische Komponente mit ei-

nem wasserlöslichen oder in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbaren Präpolymer vermischt wird, welches eine zumindest über weite Sequenzen unpolare Hauptkette aufweist, an welcher direkt oder in Seitenketten polare, hydrophile Gruppen anhaften, und daß das mit der biologischen Komponente vermischte Präpolymer bei Temperaturen von Raumtemperatur bis 70°C, vorzugsweise bis 40°C über vernetzungsfähige Gruppen nach Abdunsten des wäßrigen Lösungsmittels zu einer dreidimensional vernetzten, hydrophoben Polymermatrix reagiert, in welche die biologische Komponente eingebettet ist.

Insbesondere ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß ein Präpolymer aus der Gruppe der Polykondensations-, Polyadditions- und Polymerisationsharze verwendet wird, dessen Hauptkette zur Gruppe der Polyester, Polyamide, Epoxyharze, Phenolharze, Polyacrylate und Polymethacrylate gehört, deren polare, hydrophile Gruppen der Gruppe der Carboxylat-, Amino-, Ammonium-, Hydroxyl- und Alkoxygruppen angehören und deren vernetzungsfähige Gruppe aus ein- bis mehrfach ungesättigten Fettsäureestern,  $\beta$ -Diketo-Gruppen, sekundären Aminogruppen, geschützten Isocyanatgruppen, Epoxygruppen, Silanol- und Estergruppen bestehen, sowie daß allfällige polare Sequenzen der Hauptkette zur Gruppe der Polyoxyalkylene, vorzugsweise Polyoxyethylen der polymerisierten Acryl- und Methacrylsäuren sowie der Hydroxyalkylacrylate bzw. -methacrylate gehören.

Zum Unterschied von quervernetzenden Hydrophilpolymeren gemäß Punkt g) bestehen die in der Erfindung genannten Oligomere bzw. Präpolymere aus einer unpolaren bzw. über weite Sequenzen unpolaren Polymerhauptkette, an welcher sich direkt oder an kürzeren der Hauptkette anhaftenden tentakelartigen Seitenketten gerade sowie ionic (quarternäre Ammonium-, Amin- bzw. Carboxylatgruppen) bzw. polare (-OH, -O[-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O]<sub>m</sub> - (n = 2 - 5, m = 1 - 100, R = H, Alkyl, Acryl) u. a. Gruppen befinden, daß das Präpolymer gerade noch wasserlöslich, wasserverdünnbar bzw. in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbar ist, sowie Gruppen enthält, die unter milden Bedingungen bereits ohne Katalysatoren und ohne Anwendung von energiereicher Strahlung nach Abdunsten des Lösungsmittels von sich aus zu einem schwach polaren hydrophoben in Wasser schlecht bis mäßig quellenden dreidimensional vernetzten Matrixpolymer reagieren.

An der Vernetzung selbst sollte die biologische Komponente nicht beteiligt sein, je nach Vernetzungstyp ist es erfindungsgemäß jedoch möglich, daß in die Vernetzungsreaktion der Präpolymere auch periphere, die Funktion der biologischen Komponente nicht beeinträchtigende Bereiche der biologischen Komponente einbezogen werden. Es können auch Salzbrücken zwischen dem Biopolymer und der ionic Gruppen tragenden Polymermatrix ausgebildet werden und einen biopolymerstabilisierenden Effekt bewirken.

Ein Immobilisat, bestehend aus in einer Polymerma-

trix immobilisierten biologischen Komponenten, vorzugsweise Enzymen, ist somit erfindungsgemäß dadurch gegeben, daß das der Polymermatrix zugrundeliegende Präpolymer wasserlöslich oder in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbar ist und eine zumindest über weite Sequenzen unpolare Hauptkette aufweist, an welcher direkt oder in Seitenketten polare hydrophile Gruppen anhaften, sowie daß das Präpolymer über vernetzungsfähige Gruppen verfügt, welche nach der Polymerisation ein dreidimensionales Netzwerk bilden, in welches die biologische Komponente eingebettet ist.

Zum besseren Verständnis der Erfindung wird auf folgende Abbildungen verwiesen. Es zeigen Fig. 1 für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Präpolymere in schematischer Darstellung, Fig. 2 die Vernetzungsreaktion von geeigneten Präpolymeren via Luftsauerstoff, Fig. 3 die Vernetzungsreaktion von enaminvernetzenden Präpolymeren, Fig. 4 eine Oberflächenmodifizierung von PVC, Fig. 5 einen erfindungsgemäßen, schichtartig aufgebauten Biosensor, Fig. 6 eine Ausführungsvariante nach Fig. 5 (Glukosesensor), Fig. 7 die Kennlinie eines erfindungsgemäß hergestellten BUN (blood urea nitrogen) Sensors, Fig. 8 Sensorbeispiele a bis e, Fig. 9 die Kennlinie eines erfindungsgemäß hergestellten Glukosesensors, wobei der Strom (nA) über der Glukosekonzentration aufgetragen ist, und Fig. 10 eine weitere Ausführungsvariante eines erfindungsgemäßen Biosensors.

Es hat sich gezeigt, daß sich für diese Art der Biopolymerimmobilisierung z.B. wasserlösliche vernetzbare Lackkunstharze, deren molekularer Aufbau in Fig. 1 schematisch dargestellt ist, besonders gut eignen. In dieser Darstellung sind die hydrophoben Oligomerkettenanteile mit 1, die hydrophilen Sequenzen mit 2 und die bezüglich der Vernetzung reaktiven Gruppen mit 3 bezeichnet. Diese Substanzklasse weist Eigenschaften auf, die den erfindungsgemäßen Präpolymereigenschaften entsprechen, d. h. sie sind wasserlöslich bzw. wasserverdünnbar, verfilmen nach Abdunsten des Wassers und vernetzen in weiterer Folge nach Verlust ihres Lösungsmittels ohne fremdes Zutun bzw. unter milden Bedingungen in Gegenwart von Luftsauerstoff bzw. bei schwach erhöhter Temperatur zu einem mechanisch stabilen, wasserbeständigen nur schwach bis mäßig quellenden, an sich hydrophoben Polymer.

Beim Trocknungs- und Vernetzungsprozeß behält das Polymer gerade soviel Wasser, daß die biologische Komponente in optimal hydratisierter Form, d. h. in Form seiner optimalen Wirksamkeit inkorporiert wird. Etwaige periphere Fixierungen schmälern die Aktivität dieser Komponente nicht, vielmehr tragen sie dazu bei, daß die Migrationsneigung selbst bei weitmaschigen Vernetzungsstrukturen zusätzlich reduziert wird. Dabei ist es erfindungsgemäß von Vorteil, wenn der Moleküldurchmesser der biologischen Komponente um mindestens einen Faktor 3, vorzugsweise um einen Faktor > 10 größer ist als die Maschenweite der dreidimensional vernetzten Polymermatrix, sodaß die biologische Kompo-

nente migrationshemmend in der Polymermatrix zurückgehalten wird.

Zu den erfindungsgemäßen Oligomer- bzw. Präpolymersystemen sind folgende Substanzklassen zu zählen:

5 Fettsäuremodifizierte Polyester (Ölalkydharze), deren Hauptkette eine Polyesterkette darstellt, an der via Esterbildung ein- bis mehrfach ungesättigte Fettsäuren tentakelartig geknüpft sind. Die Wasserlöslichkeit bzw. 10 Wasseremulgierbarkeit wird durch Einbau ionischer bzw. polarer Gruppen in die Hauptkette bzw. durch Insertieren hydrophiler Sequenzen in die Hauptkette erzielt. Die Vernetzung geschieht via Luftsauerstoff, wobei die Fettsäureseitenketten intermolekular über Peroxidbrücken verknüpft sind. Für die Schaffung der einzelnen 15 Strukturelemente können folgende Ausgangssubstanzen verwendet werden: Bifunktionelle Säuren wie Phthalsäureanhydrid, Terephthalsäure, Isophthalsäure, bifunktionelle aliphatische Säuren wie Bernsteinsäure, Adipinsäure, u. a. bifunktionelle Alkohole wie Ethylenglykol, Propylenglykol, Neopentylglykol, Bio- 20 phenol A, Butylenglykol, Di- und Triethylenglykol, Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Monoglyceride ein bis mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Umesterungsprodukte von Lein-, Rizinen-, Holz-, Tallölen und anderen natürlichen sowie synthetischen Fettsäuretriglyceriden mit multifunktionellen Alkoholen wie Pentaerithrit, organische Säuren mit einer Funktionalität  $\geq 3$  sowie Frucht- 25 säuren u. a.

Das Bauprinzip sowie die Vernetzungsreaktion ist in Fig. 2 dargestellt.

Bei der beschriebenen Vernetzung mit Sauerstoff kann erfindungsgemäß bei Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes auf Werte über 250 mbar, vorzugsweise auf 35 Werte über 500 mbar, die Vernetzungstemperatur unter Raumtemperatur, vorzugsweise auf Temperaturen von 0 bis 5°C abgesenkt werden. Dies kann bei der Einbettung temperaturempfindlicher Enzyme von großem Vorteil sein.

40 In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung ist vorgesehen, daß als Präpolymer enaminvernetzende Präpolymere, vorzugsweise Polyacrylate oder Polymethacrylate verwendet werden, welche durch Abdunsten des Lösungsmittels Wasser vernetzt werden.

45 Enaminvernetzende Polymere sind im wesentlichen mit sekundären multifunktionellen Aminen neutralisierte carboxylat- und  $\beta$ -diketogruppentragende Polyacrylate bzw. Polymethacrylate, bei denen das Oligomer in Form einer wäßrigen Emulsion vorliegt. Diese daraus gefertigten Oligomer-Biopolymerschichten verfilmen beim 50 Abdunsten des Lösungsmittels zu einer porenfreien dichten Matrix, welche bei Raum- bzw. leicht erhöhter Temperatur (50°C) zu einem transparenten schwach quellenden (die Gewichtszunahme nach 2 Stunden Naßlagerung beträgt maximal 15%) Polymerfilm mit eingelagerter 55 biologischer Komponente vernetzt. Das Vernetzungsschema ist in Fig. 3 dargestellt.

Als biologische Komponente kann bevorzugt ein

bzw. mehrere Enzyme aus der Gruppe der Oxidoreduktasen, vorzugsweise Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4), Lactatoxidase (EC 1.1.3.2) oder Ascorbatoxidase (EC 1.10.3.3); ein Enzym aus der Gruppe der Hydrolasen, vorzugsweise Urease (EC 3.5.1.5), Kreatinase (EC 3.5.3.3) oder Kreatininase (EC 3.5.4.21) eingesetzt werden.

Es ist leicht ersichtlich, daß sowohl Vernetzungsgrad als auch Quelfähigkeit in Richtung guter Substratpermeabilität bei minimaler Migration der biologischen Komponente über den Gehalt an vernetzungsfähigen Regionen bzw. Gruppen sowie über das Verhältnis polare zu unpolare Oligomerkettensequenzen steuerbar, also über die Maschenweite und Hydratisierbarkeit sowohl der Polymerkette als auch der Vernetzungsbrücken beeinflussbar ist.

Zur großen Familie der wasserverdünnbaren bzw. mit Wasser dispergierbaren Oligomere, die im Zuge einer milden Vernetzungsreaktion hydrophobisiert werden, gehören ferner:

Silikonharzmodifizierte Ölkalydharze = Fettsäuremodifizierte Polyester-Silikon-Copolymerisate, Isocyanatharze mit geschützter Isocyanatgruppe, Epoxyharze mit hydrolysegeschützter Epoxylfunktionalität sowie sämtliche Hybridharze, deren Merkmale jenen der für die erfindungsgemäße Immobilisierung von Biopolymeren befähigten Oligomeren entsprechen.

Wie bereits erwähnt, finden die Vernetzungsreaktionen nach Verlust des Lösungsmittels, d. h. im Zuge der Annäherung der reaktiven Gruppen bereits bei Raumtemperatur statt, d. h., sie können, müssen jedoch nicht zusätzlich katalysiert werden. Im Falle der oxidativen Trocknung von Ölkalydharzen kann die Vernetzungsreaktion durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes sowie durch leichte Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40° bis maximal 60° C auch auf einfache Weise beschleunigt werden.

Kondensationsvernetzende Systeme, wie z. B. die enaminvernetzenden  $\beta$ -diketomodifizierten Poly(meth-)acrylate zeigen bei schwach erhöhter Temperatur eine deutlich forcierte Trocknung. Vakuumbehandlung bzw. Absenken der relativen Luftfeuchtigkeit wirken sich sowohl auf Geschwindigkeit als auch auf den Vernetzungsgrad positiv aus.

Ein generelles Problem bei der Entwicklung von Biosensoren mit Langzeitstabilität in wäßrigen Systemen ist die Haftung zwischen Immobilisat und Untergrund, wobei es sich beim Untergrund lediglich um eine Trägersoberfläche aber auch um die Oberfläche eines sensitiven Elementes handeln kann. Ein erfindungsgemäßer Biosensor zeichnet sich nun dadurch aus, daß der Sensor eine Trägerschicht aufweist, welche dahingehend chemisch modifiziert ist, daß diese zumindest eine dem Präpolymer des Immobilisates analog vernetzungsfähige Gruppe zum Zwecke der Haftverbesserung zwischen Immobilisat und Trägerschicht aufweist.

Im Falle von oxidativ trocknenden Präpolymeren kann eine Haftverbesserung z. B. dann erzielt werden,

wenn man den Untergrund durch Immobilisierung von ungesättigten Fettsäuren (doppelbindungstragende Fettsäuren) via Ester oder Amid modifiziert.

Die Kombination von Enzymimmobilisatschichten mit ionensensitiven Elektroden ist dann sinnvoll, wenn bei der enzymatischen Umsetzung eines zum Beispiel klinisch relevanten Substrates ein Ion entsteht, welches mit einer geeigneten ionensensitiven Elektrode gemessen werden kann. In üblicher Weise besteht das sensitive Element derartiger Elektroden aus einer Mischung aus PVC, Weichmacher und geeigneten Ionophor. Will man eine derartige ionensensitive Membran in Bezug auf die Vernetzung mit dem Präpolymer der Enzymschicht funktionalisieren, so modifiziert man den PVC-Anteil der Membran, d. h. man verwendet statt normales PVC ein funktionalisiertes (z. B. carboxyliertes Polyvinylchlorid der Fa. Aldrich-Artikel No. 18,955-3) und modifiziert es gemäß den Anforderungen.

Es hat sich gezeigt, daß enaminvernetzende Oligomersysteme dann einen guten Haftverbund zu derartigen ionensensitiven Membranen eingehen, wenn man Carboxy-PVC mit Polyaminen der Klasse  $H_2N-(R-NH)_n$   $R-NH_2$  wobei  $R = (CH_2)_m$ ;  $n = \text{größer } 1$  vornehmlich  $1-3, m = 1-10$  bzw. anderen mindestens eine sekundäre Aminogruppe enthaltenden Substanzklassen mit Carbo-diimid umsetzt. Bei niederem Carboxylierungsgrad des PVC's kommt es durch derartige Modifizierungen zu keiner Beeinträchtigung der Elektrodeneigenschaften wie Selektivität, Membranwiderstand, Ionophorenauswaschbarkeit etc. (s. Fig. 4).

In einer Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, daß mehrere schichtartig angeordnete Immobilisate vorgesehen sind, welche das gleiche Matrixmaterial jedoch unterschiedliche biologische Komponenten aufweisen. Versieht man ein weitgehend vernetztes Immobilisat mit einer weiteren, eine biologische Komponente erhaltenden Präpolymerschicht, so wächst dieses Präpolymer nach Abdunsten des Wassers im Zuge der einsetzenden Vernetzungsreaktion mit der unteren Schicht zu einer durchgehenden 3-dimensional vernetzten Polymermatrix zusammen.

Auf diese Weise kann man einen in Bezug auf das Einbettungspolymer homogenen Schichtverbund erzeugen, wobei das bzw. jedes der schichtartig angeordneten Immobilisate mehrere biologische Komponenten nebeneinander beinhalten kann. Durch diese Maßnahme gelingt es in einer Schicht mehrere biokatalytische bzw. reaktive Domänen räumlich getrennt anzuordnen. In zumindest einem dieser Immobilisate kann man auf diese Weise auch katalytisch aktive und/oder ladungsableitende Partikel wie Edelmetallkolloide, reaktive bzw. katalytisch wirkende anorganische Partikel, Metallpigmente sowie lichtisolierende Pigmente aber auch Kohlenstoffpigmente wie Graphit, Aktivkohle, Glassy carbon, edelmetalldotierten Kohlenstoff etc. einbringen. Ziel einer derartigen Maßnahme ist die Schaffung von Schichten, die biokatalytische sowie für die Bestimmung eines Analyten relevanten bzw. elektrochemisch aktive aber auch

elektronenleitende Domänen schichtartig übereinander positioniert enthalten.

Wie in Fig. 5 dargestellt, kann ein derartiger Biosensor auf einer Trägerschicht 4 mehrere Immobilisate  $S_1$  bis  $S_4$  aufweisen, welche nach deren Vernetzung eine einheitliche Polymermatrix 5 bilden. Die einzelnen Immobilisate weisen Enzyme  $Enz_1$  bis  $Enz_3$  auf, in das Immobilisat  $S_4$  können katalytische und/oder ladungsableitende Partikel eingelagert sein.

Durch diese Maßnahme gelingt es Schichten zu erzeugen, in denen enzymkatalysierte Reaktionskaskaden bis hin zum eigentlichen Sensorelement ablaufen können, im Falle der amperometrischen Bestimmung von Substraten, wie z. B. Glucose (s. Fig. 6) ist es möglich, ein elektrokatalytisches Elektrodenelement, welches auf das bei der enzymatischen Reaktion entstehende Folgeprodukt sensitiv ist, in die Schicht  $S_4$  mitzuintegrieren. ( $Enz_1$  = Catalase und  $Enz_2$  = GOD). Das Immobilisat  $S_4$  beinhaltet Pt und Kohlepartikel.

Als besonders vorteilhaft hat sich ein Immobilisat mit einer biologischen Komponente erwiesen, welche zusätzlich ein elektrokatalytisches Elektrodenelement enthält. Zu diesem Zwecke wird ein wäßriges Oligomer samt Enzymsystem mit Platin und Kohlepartikeln so gefüllt, daß nach Abdunsten des Wassers und nach Vernetzung des Oligomeren eine leitfähige enzymtragende Schicht entsteht. In dieser Ausgestaltungsform ist das Enzym an der Kohle-Elektrodenoberfläche nicht adsorbiert gebunden, sondern in den Zwischenräumen des porösen Elektrodenmaterials im 3-dimensional vernetzten Trägerpolymer molekulardispers eingesiegt. Eine besondere Ausführungsform hierfür ist die Tränkung sogenannter elektrokatalytischen Kohlepapiere, bei denen edelmetallhaltige Kohle (z. B. Glassy carbon) schichtartig auf einem Trägervlies aufgebracht ist (s. Beisp. 7).

Im folgenden sind einige Beispiele einer erfindungsgemäßen Enzymimmobilisierung dargestellt:

#### Beispiel 1

##### Sensorelement zur Bestimmung von Harnstoff in biologischen Medien, wie z. B. in Blut

Bei der enzymatischen Umsetzung von Harnstoff entsteht Ammoniak, demnach kann man einen BUN-sensitiven Sensor dahingehend herstellen, indem man auf einen pH- bzw.  $NH_4^+$  Sensor eine erfindungsgemäße Urease-Immobilisat aufbringt. In diesem Beispiel soll die Kombination Ureaseimmobilisat und ammoniumsensitive Elektrode dargestellt werden.

a) Herstellung eines mit sekundären Aminogruppen modifizierten PVC

10 g Carboxy-PVC (Carboxy-Gehalt 1,8% - Aldrich Chem. Corp.) werden in 150 ml THF (Flukapuriss. pa) gelöst und mit 600 mg Dicyclohexylcarbodiimid (Fluka) sowie 500 mg Bishexamethylen-triamin (Merck) versetzt.

Nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung in 1000 ml Aceton eingebracht und das modifizierte Polymer durch Zusatz von 250 ml destilliertem Wasser gefüllt. Die Füllung wird abfiltriert, mit Aceton, Ethanol und dest. Wasser gewaschen und nach 2-stündigem Suspendieren in Ethanol abgenutscht. Nach Vakuumtrocknung erhält man ein beigegefärbtes flockiges Pulver.

b) Herstellen der ammoniumsensitiven Membran

300 mg Amino-PVC werden mit 10 mg Nonactin, in 3,5 g Tetrahydrofuran (Fluka puriss. pa) gelöst und mit 660 mg Bis(1-butylpentyl)adipat versetzt.

Diese Membranflüssigkeit kann z.B. in das Membranfenster eines Elektrodengehäuses (siehe DE 2 854 444 C2) eingebracht bzw. mit einem planen leitenden Untergrund fest kontaktiert werden.

c) Immobilisierung des Enzyms

In 1 ml physiologischen Phosphatpuffer (pH 7,4) werden 0,5 ml einer wäßrigen ketiminvernetzenden Polyacrylatemulsion (Harzgehalt = 40%) eingebracht und mit 100 mg Urease (von der Schwertbohne - 124 U/mg; Fluka) versetzt. Diese Mischung ist lagerstabil und kann einige Wochen bei 0 bis +4°C gelagert werden. Die Mischung wird mit einem Dispensor auf die ammoniumsensitive Membran aufgetropft und eine Woche bei Raumtemperatur oder 2 Tage bei 35 bis 40°C gelagert.

Der Enzymaktivitätstest zeigt, daß während des Vernetzungsprozesses ein Aktivitätsverlust von lediglich 10 bis 15 % zu beobachten ist, bei weiterer Naßlagerung in einem physiologischen Puffersystem konnte kein weiterer Aktivitätsverlust mehr festgestellt werden. Verglichen mit ammoniumsensitiven Membranen, die nicht-modifiziertes PVC als Membranpolymer beinhalten, zeigt der erfindungsgemäße Verbund aus Elektrodenmembran und Immobilisat selbst bei Naßlagerung im Puffermedium eine sehr gute Haftung, so kann die Immobilisatschicht von der ammoniumsensitiven Membran nur unter gleichzeitiger Zerstörung derselben entfernt werden. Die Wasseraufnahme durch Quellung der Immobilisatschicht ist mäßig und beträgt nach mehrstündiger Lagerung im physiologischen Puffersystem 14%. Dieses Faktum gewährleistet eine gute Ammoniumpermeabilität, aufgrund der Sensorstabilität kann auf eine echte Enzymimmobilisierung geschlossen werden. Fig. 7 zeigt eine Kennlinie einer erfindungsgemäßen BUN (blood urea nitrogen) Elektrode, wobei die BUN-Konzentration über der Potentialdifferenz aufgetragen ist.

Beispiele 2 bis 6Sensorelement zur Bestimmung von Glukose in biologischen Medien

Bei der Umsetzung von Glukose in Gegenwart von Glukoseoxidase und bei Abwesenheit von Mediatoren entsteht Gluconolacton sowie Wasserstoffperoxid amperometrisch, welches wiederum anodisch zu Sauerstoff oxidiert werden kann. Der dabei fließende Strom ist ein Maß für den Glukosegehalt der Probe. Im folgenden seien einige Beispiele für die Anwendung eines aus mehreren Immobilisaten gemäß vorliegender Erfindung aufgebauten Sensorelementes dargestellt.

Herstellung der Ausgangskomponenten:

## a) Herstellung von Leinölfettsäureamidohexylamin:

0,2 mol Leinölfettsäure (techn.) werden mit 0,2 mol 1,6-Diaminohexan (pa Merck) und 0,2 mol Dicyclohexylcarbodiimid (Fluka) in einem Liter Ethylacetat unter Inertgas bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird der entstandene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die organische Phase mit einer verdünnten Kaliumchloridlösung mehrmals gewaschen. Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird unter Schutzgasbeaufschlagung solange eingeeengt, bis ein bräunliches Öl zurückbleibt. Das Reaktionsprodukt wird über Calciumoxid unter Argon gelagert.

## b) Trägermaterial:

Mit einer Gold-Ableitbahn besputterte Polymethylmethacrylatplättchen werden mit 35 volumsprozentiger Schwefelsäure oberflächlich hydrolysiert und in einer das Trägerplättchen nicht zu stark anquellenden Lösungsmittelmischung mit Leinölfettsäureamidohexylamin und Dicyclohexylcarbodiimid (Fluka) 24 Stunden bei Raumtemperatur und unter Inertgas umgesetzt. Die Plättchen werden mit Benzin gewaschen und sofort weiter verarbeitet.

c) 1g mit ungesättigten Fettsäuren modifizierter Polyester (Ölalkydharz der Fa. Vianova 40%ig in Wasser) werden mit 0,5 g Platin 10% auf Aktivkohle (Fluka) sowie mit 0,5 g Graphit (Merck) vermischt und mit soviel Wasser versetzt, daß eine mit einer Laborschwingmühle bearbeitbare Paste entsteht. Die aufgeschlossene Paste läßt sich bei Raumtemperatur unter Inertgas lagern.

d) 1g der Paste (C) wird mit 0,05 g Glukoseoxidase (EC 1.1.3.4-15.000-25.000 Units/g) vermischt und bei Raumtemperatur unter Inertgas gelagert.

e) 1g Ölalkydharz 40% in Wasser werden mit 0,05 bis 0,1 g GOD (EC 1.1.3.4-15.000-25.000 Units/g) vermischt und die entstandene Harz-Enzym-

Lösung bei Raumtemperatur unter Inertgas gelagert.

f) 1g Ölalkydharz 40% in Wasser werden mit 0,05 g Catalase (EC 1.11.1.6-5.000 Units/g) vermischt und die so entstandene Harz-Enzymlösung im Kühlschrank unter Inertgas gelagert.

g) 0,5 g Kaliumhexachloroplatinat (IV) wird in etwa 10 ml Wasser gelöst und mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu einer braunen Platinkolloidsuspension reduziert. Nach gründlichem Dialysieren wird die Kolloidsuspension im Verhältnis 1 : 2 mit dem Ölalkydharz vermischt und bei Raumtemperatur unter Schutzgas gelagert.

## Sensorbeispiele:

Beispiel 2

Auf den Sensorträger 4 mit einer Goldableitung G, hergestellt gemäß Punkt b), wird mit einem 200-400µm Spacer die Pastenformulierung P1 (gemäß c) so aufgebracht, daß die Schichte die Gold-Ableitbahn G kontaktiert. Nach einem mehrstündigen Trocknungsschritt bei Raumtemperatur wird die GOD-Präpolymersmischung GP (nach Punkt e) in einer Schichtstärke von etwa 30 - 100µm (Naßfilm) aufgebracht (Fig. 8a). Die Ausschnittsvergrößerung der Schicht P1 zeigt Pt-Kohle-Partikel 10, Graphitpartikel 10' und das vernetzte Polymer 12.

Beispiel 3

Vorgangsweise wie bei Beispiel 2, nach Antrocknen der GOD-Präpolymersmischung GP werden etwa 30 - 100µm (bezogen auf Naßfilm) der Catalase-Präpolymersmischung CP (nach Punkt f) aufgebracht (Fig. 8b).

Beispiel 4

Wie Beispiel 3, anstelle der Catalase-Präpolymerlösung wird die Platinkolloid-Präpolymersmischung PP (nach Punkt g) aufgebracht (Fig. 8c).

Beispiel 5 und 6

Die Paste P2 (gemäß Punkt d) wird auf das Trägerplättchen 4 analog Paste P1 in den Beispielen 2-4 aufgebracht und nach Antrocknen analog Beispiel 3 bzw. Beispiel 4 mit den Formulierungen CP bzw. PP überschichtet (Fig. 8d und 8e).

Sämtliche Sensorvarianten werden mehrere Stunden bis mehrere Tage in einer  $\text{O}_2$ -angereicherten Atmosphäre bzw. an Luft der oxidativen Trocknung unterworfen und nach vollständigem Vernetzen in einem physiologischen Puffer gelagert. Das zusätzliche Aufbringen der Catalase- bzw. Platinmetall-Kolloidschichte ermög-

licht zum einen eine Prolongierung des linearen Bereiches, zum anderen wird - was Forderung für die in vivo Messung ist - verhindert, daß  $H_2O_2$  in den Probenraum abdiffundiert.

In Fig. 9 ist ein Diagramm Strom versus Glukosekonzentration in einem physiologischen Puffer dargestellt.

#### Beispiel 7

Gemäß Fig. 10 wird ein Kunststoffträger 6 mit einer topfartigen Vertiefung 7 so mit Gold besputtert, daß die Oberfläche des vertieften Bereiches mit der Kontaktierungsstelle 8 des Sensorträgers eine elektrisch leitende Einheit wird. In diese Vertiefung 7 wird ein Scheibchen 9 bestehend aus Pt-Kohle auf einem Trägervlies eingepreßt. 100 mg Lactatoxidase v. *Pediococcus* species (L 0638 Sigma - 30 Units/mg) werden in 1 ml physiologischen Phosphatpuffer gelöst und mit 0,5 ml enaminvernetztem Polyacrylat-Präpolymer (40% in Wasser) vermischt.

Die eingepreßte Pt-Kohlelektrode wird mit der Enzym/Präpolymerlösung getränkt, bei Raumtemperatur getrocknet und vernetzt. In der Ausschnittsvergrößerung sind mit 10 die mikroporösen Pt-Kohle-Partikel und mit 11 das Enzympolymer bezeichnet.

Das resultierende Sensorelement (Fig. 10) zeigt in Bezug auf Stromfluß Linearität bis zu einer Lactatkonzentration von 15 mmol/l und besitzt, verglichen mit einem Sensorelement, bei dem die Lactatoxidase auf dem identen Pt-Kohlenstoff-Elektrodenmaterial adsorptiv gebunden ist, eine um den Faktor >5 höhere Betriebsdauer.

#### Patentansprüche

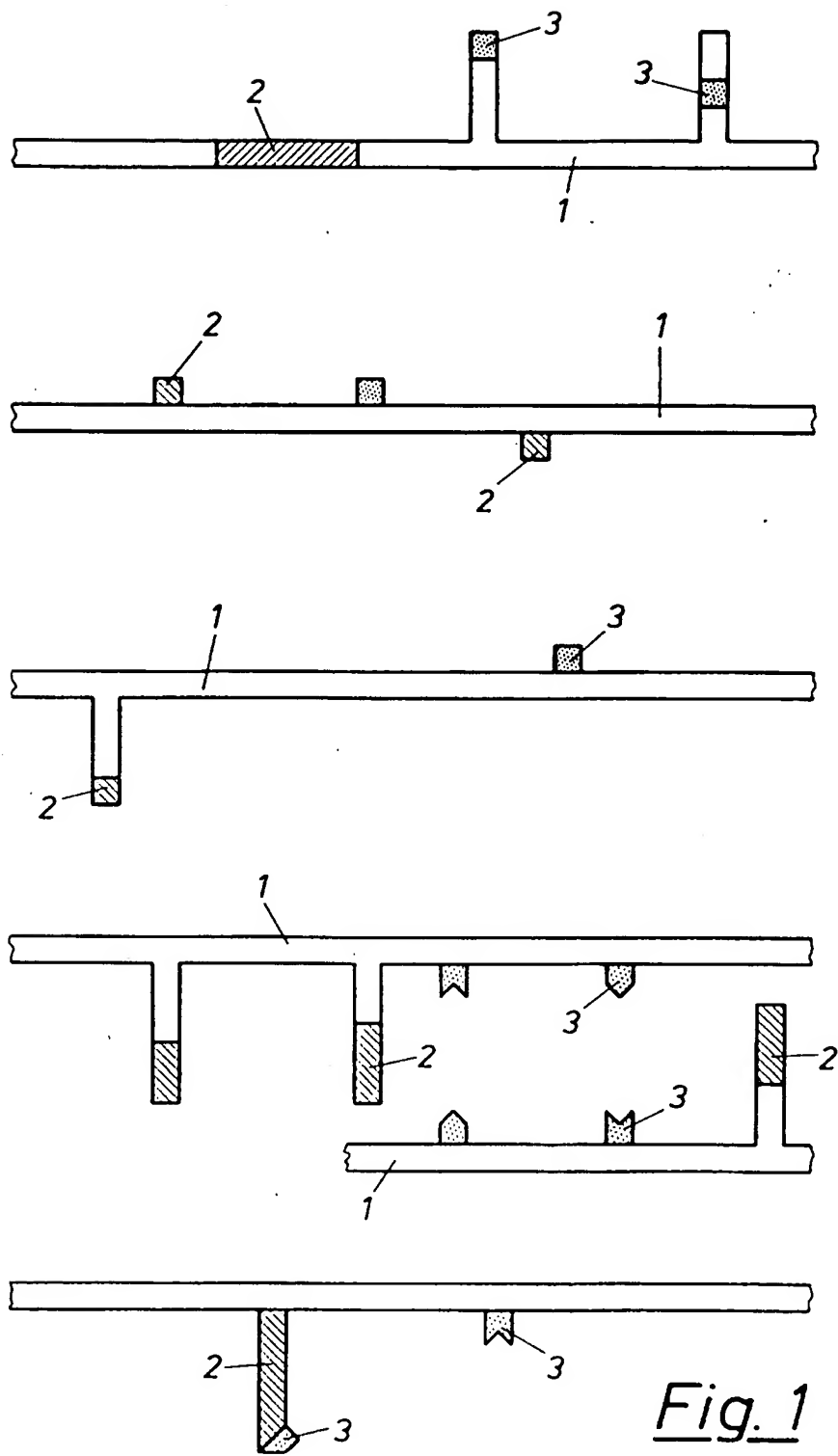
1. Verfahren zur Immobilisierung von biologischen Komponenten, vorzugsweise von Enzymen, in einer Polymermatrix, **dadurch gekennzeichnet**, daß zumindest eine biologische Komponente mit einem wasserlöslichen oder in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbaren Präpolymer vermischt wird, welches eine zumindest über weite Sequenzen unpolare Hauptkette aufweist, an welcher direkt oder in Seitenketten polare, hydrophile Gruppen anhaften, und daß das mit der biologischen Komponente vermischte Präpolymer bei Temperaturen von Raumtemperatur bis 70°C, vorzugsweise bis 40°C über vernetzungsfähige Gruppen nach Abdunsten des wäßrigen Lösungsmittels zu einer dreidimensional vernetzenden, hydrophoben Polymermatrix reagiert, in welche die biologische Komponente eingebettet ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Präpolymer aus der Gruppe der Polykondensations-, Polyadditions- und Polymerisationsharze verwendet wird, dessen Hauptkette

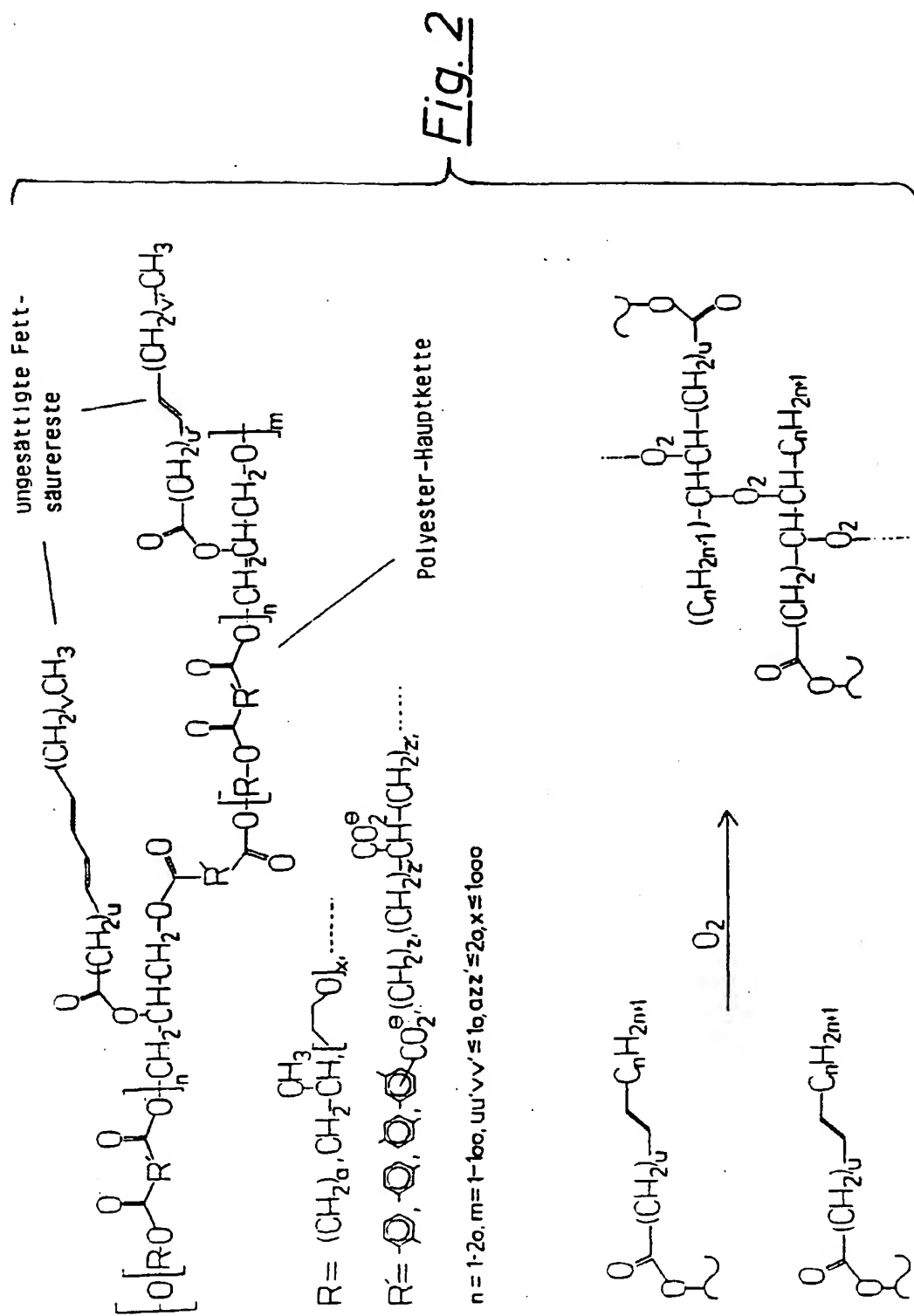
zur Gruppe der Polyester, Polyamide, Epoxyharze, Phenolharze, Polyacrylate und Polymethacrylate gehört, deren polare, hydrophile Gruppen der Gruppe der Carboxylat-, Amino-, Ammonium-, Hydroxyl- und Alkoxygruppen angehören und deren vernetzungsfähige Gruppe aus einbis mehrfach ungesättigten Fettsäureestern,  $\beta$ -Diketol-Gruppen, sekundären Aminogruppen, geschützten Isocyanatgruppen, Epoxygruppen, Silanol- und Estergruppen bestehen.

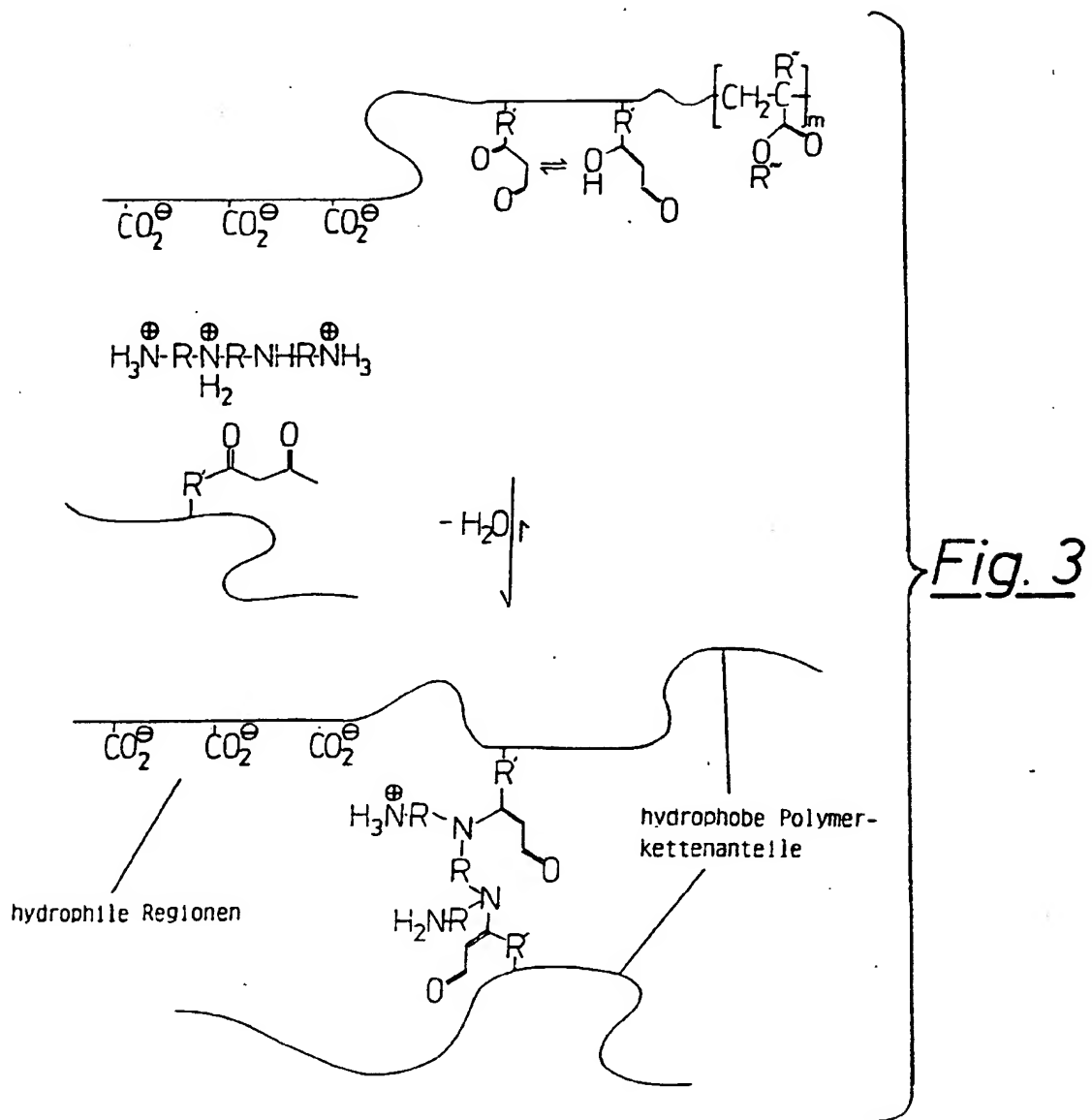
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß allfällige polare Sequenzen der Hauptkette zur Gruppe der Polyoxyalkylene, vorzugsweise Polyoxyethylen der polymerisierten Acryl- und Methacrylsäuren sowie der Hydroxyalkylacrylate bzw. -methacrylate gehören.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in die Vernetzungsreaktion der Präpolymere auch periphere, die Funktion der biologischen Komponente nicht beeinträchtigende Bereiche der biologischen Komponente einbezogen werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Moleküldurchmesser der biologischen Komponente um mindestens einen Faktor 3, vorzugsweise um einen Faktor > 10 größer ist als die Maschenweite der dreidimensional vernetzten Polymermatrix, sodaß die biologische Komponente migrationshemmend in der Polymermatrix zurückgehalten wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Präpolymer fettsäuremodifizierte Polyester (Ölalkydarze) verwendet werden, welche mittels Luftsauerstoff vernetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes auf Werte über 250 mb, vorzugsweise auf Werte über 500 mb, die Vernetzungstemperatur unter Raumtemperatur, vorzugsweise auf Temperaturen von 0 bis 5°C abgesenkt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Präpolymer enaminvernetzende Präpolymere, vorzugsweise Polyacrylate oder Polymethacrylate verwendet werden, welche durch Abdunsten des Lösungsmittels Wasser vernetzt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biologische Komponente ein Enzym aus der Gruppe der Oxidoreduktasen eingesetzt wird.

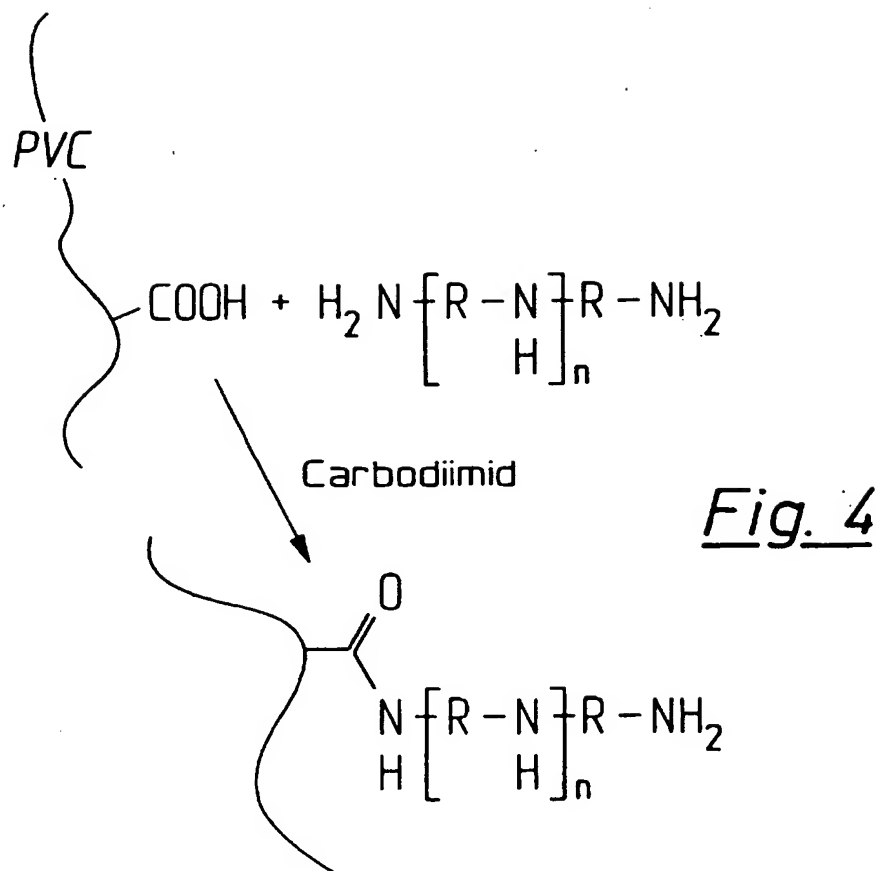


10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4), Lactatoxidase (EC 1.1.3.2) oder Ascorbat-oxidase (EC 1.10.3.3) eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biologische Komponente ein Enzym aus der Gruppe der Hydro-lasen eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym Urease (EC 3.5.1.5), Kreatinase (EC 3.5.3.3) oder Kreatininase (EC 3.5.4.21) eingesetzt wird.
13. Immobilisat, bestehend aus in einer Polymermatrix immobilisierten biologischen Komponenten, vorzugsweise Enzymen, **dadurch gekennzeichnet**, daß das der Polymermatrix zugrundeliegende Präpolymer wasserlöslich oder in Wasser ohne Hilfsmittel emulgierbar ist und eine zumindest über weite Sequenzen unpolare Hauptkette aufweist, an welcher direkt oder in Seitenketten polare hydrophile Gruppen anhaften, sowie daß das Präpolymer über vernetzungsfähige Gruppen verfügt, welche nach der Polymerisation ein dreidimensionales Netzwerk bilden, in welches die biologische Komponente eingebettet ist.
14. Immobilisat nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Präpolymer ein Polymer aus der Gruppe der Polykondensations-, Polyadditions- und Polymerisationsharze ist, dessen Hauptkette zur Gruppe der Polyester, Polyamide, Epoxiharze, Phenolharze, Polyacrylate und Polymethacrylate gehört, deren polare, hydrophile Gruppen der Gruppe der Carboxylat-, Amino-, Ammonium-, Hydroxyl- und Alkoxygruppen angehören und deren vernetzungsfähige Gruppe aus einbis mehrfach ungesättigten Fettsäureestern,  $\beta$ -Diketo-Gruppen sekundären Aminogruppen, geschützten Isocyanatgruppen, Epoxygruppen, Silanol- und Estergruppen bestehen.
15. Immobilisat nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß allfällige polare Sequenzen der Hauptkette zur Gruppe der Polyoxyalkylene, vorzugsweise Polyoxyethylen der polymerisierten Acryl- und Methacrylsäuren sowie der Hydroxyalkylacrylate bzw. -methacrylate gehören.
16. Immobilisat nach einem der Ansprüche 13 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polymermatrix ein Ölalkyldharz ein Polyacrylat oder ein Polymethacrylat ist.
17. Biosensor mit einem Immobilisat nach einem der Ansprüche 13 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Sensor eine Trägerschicht (4) aufweist, welche dahingehend chemisch modifiziert ist, daß diese zumindest eine dem Präpolymer des Immobilisates ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ) analog vernetzungsfähige Gruppe zum Zwecke der Haftverbesserung zwischen Immobilisat und Trägerschicht (4) aufweist.
18. Biosensor nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehrere schichtartig angeordnete Immobilisate ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ) vorgesehen sind, welche das gleiche Matrixmaterial (5) jedoch unterschiedliche biologische Komponenten ( $Enz_1$ ,  $Enz_2$ ,  $Enz_3$ ) aufweisen.
19. Biosensor nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß das bzw. jedes der schichtartig angeordneten Immobilisate ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ) mehrere biologische Komponenten beinhaltet.
20. Biosensor nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehrere biologische Komponenten in Form eines Multienzymsystems vorgesehen sind.
21. Biosensor nach einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß in das Immobilisat ( $S_4$ ) katalytische und/oder ladungsableitende Partikel eingelagert sind.
22. Biosensor nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den katalytisch aktiven Partikeln um Edelmetallkolloide bzw. Edelmetallpigmente handelt.
23. Biosensor nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den katalytisch aktiven Partikeln um Manganoxid handelt.
24. Biosensor nach einem der Ansprüche 21 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den leitfähigen Partikeln um Graphit, Glaskohle oder Aktivkohle handelt.









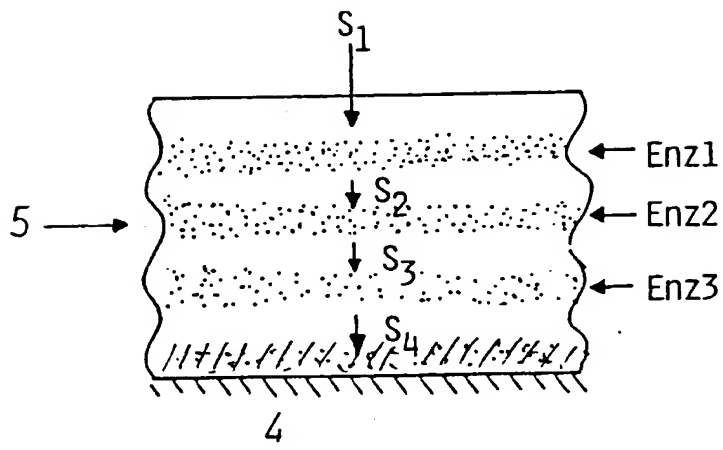


Fig. 5

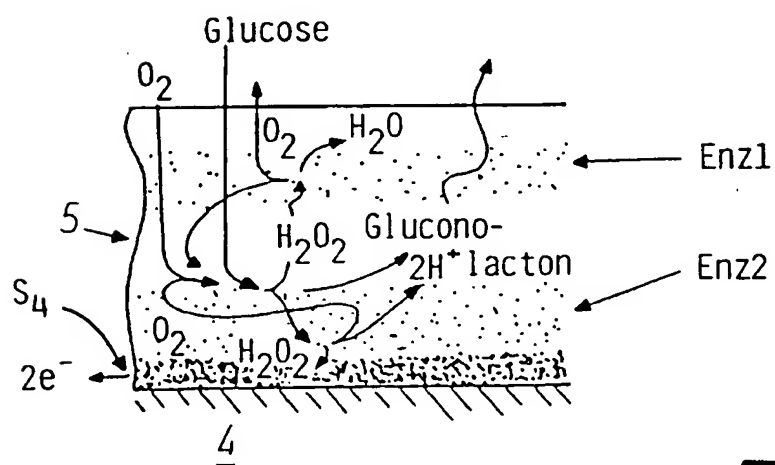
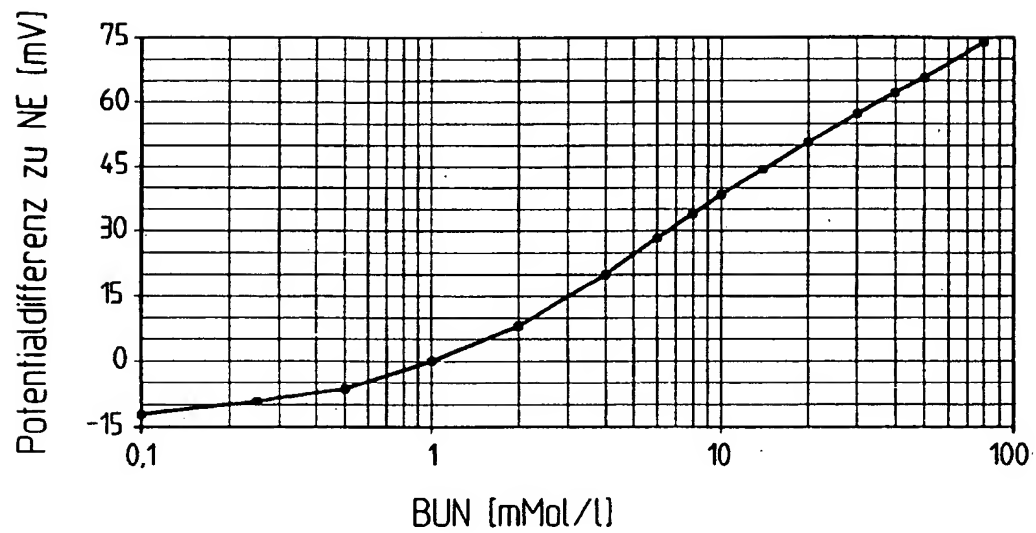
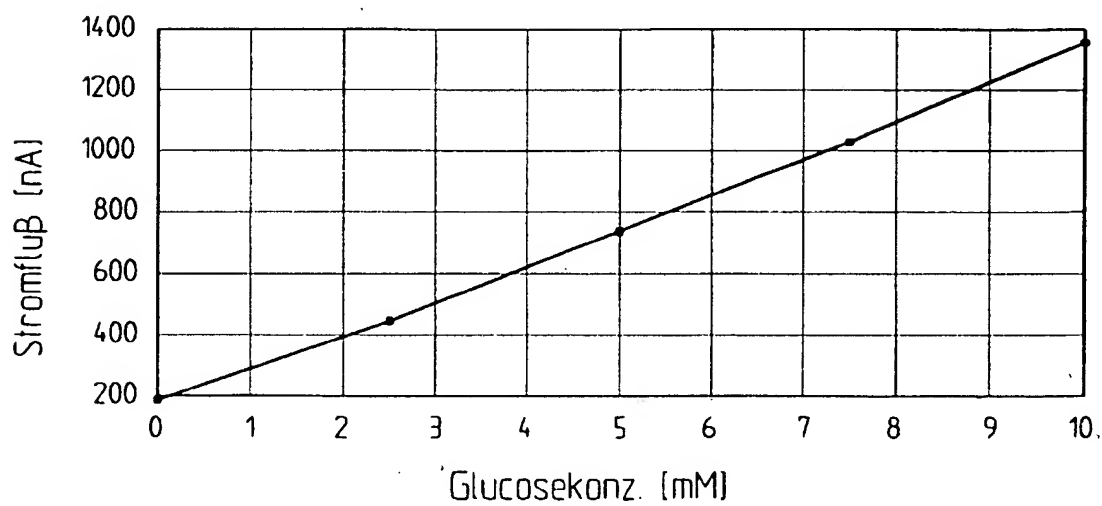


Fig. 6

Fig. 7Fig. 9

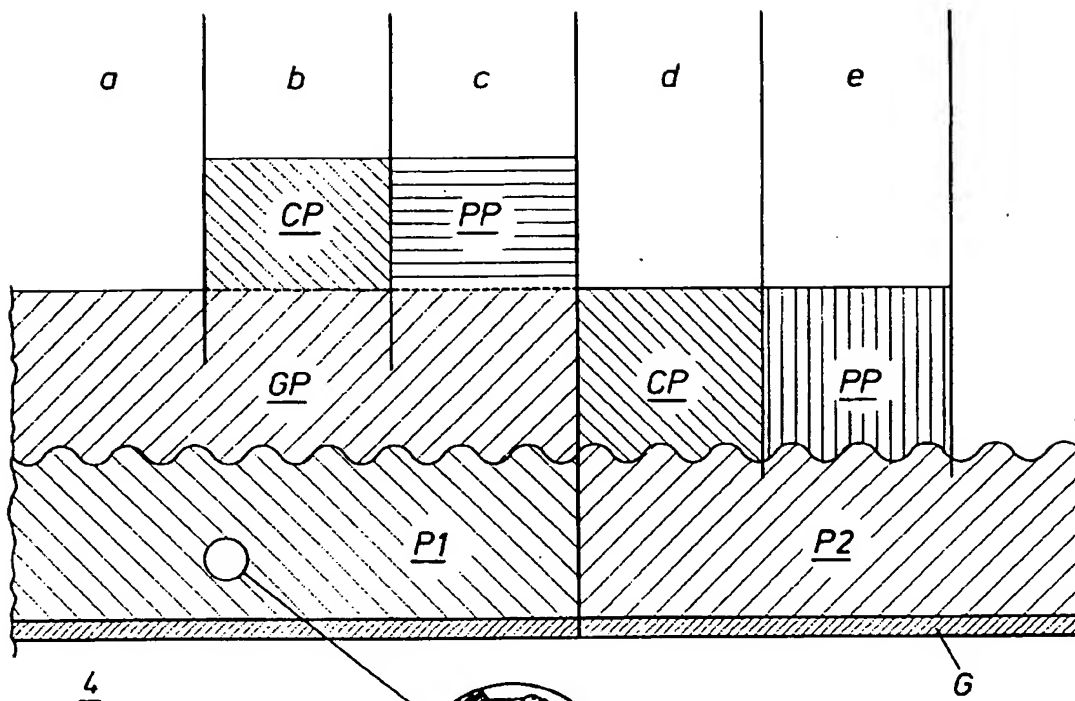


Fig. 8

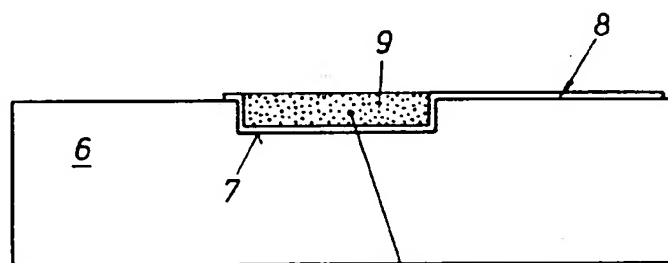


Fig. 10